Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 12:27 IRDT on Thursday April 27th 2017

بررسی درصد زنده مانی و فعالیت متابولیکی سلول در رده سلولی NB4 تیمار شده با AZT

هاجر مردانی ولندانی[1]، روح الله میرزایی خلیل آبادی[1]، داوود بشاش[2]، دکتر ناهید عین اللهی[3]، دکتر کامران علی مقدم[4]، دکتر اردشیر قوام زاده[5]، دکتر سید حمیدالله غفاری[4]

چکیده

زمینه و هدف: *لوسمی پرومیلوسیتیک حاد(APL) یکی از لوسمی های شایع است که حدود ۱۰-۵ ٪ از بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوبلاستی را در برمی گیرد. در درمان بیماران از ATRA و اخیرا از آرسنیک استفاده می شود. آترا باعث مقاومت به درمان و آرسنیک در دوز بالا سمی است. AZT با القاء اثرات مختلف باعث مرگ سلولی می شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر AZT ، مهار کننده تلومراز، بر رده سلولی NB4 (رده سلولی APL) جهت کاستن اثرات سمی دوز بالای آرسنیک می باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه زنده مانی سلولهای NB4 تیمار شده با دوزهای مختلف AZT (50,100,200μM) از طریق روش تریپان بلو و فعالیت متابولیک سلولی به وسیله روش MTT بررسی شدند.*

یافته ها: *در این مطالعه سلول های تیمار شده با دوزهای AZT=50,100,200 μM کاهش درصد زنده مانی قابل توجهی، هم به صورت وابسته به دوز و هم وابسته به زمان، با روش تریپان بلو و کاهش فعالیت سلولی با MTT نشان دادند.*

بحث و نتیجه گیری: *با توجه به اینکه AZT توانایی القاء آپوپتوز دارد و همچنین باعث کاهش فعالیت سلولی می شود به نظر میرسد داروی مناسبی برای مهار رشد سلول های توموری باشد.*

واژه های کلیدی: *لوسمی پرومیلوسیتیک حاد ، سلول NB4، AZT*

* نویسنده مسئول:
دکتر سید حمید الله غفاری ؛
دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
Email:
Shghaffari200@yahoo.com

- دریافت مقاله : اردیبهشت ۸۹ - پذیرش مقاله : شهریور ۸۹

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتی حاد (Acute Promyelocytic Leukemia(APL)) یا AML-M3 یکی از انواع لوسمی‌های حاد میلوئیدی است که حدود۱۰-۵٪ از مبتلایان به سرطان حاد میلوبلاستی را در بر می‌گیرد.

این بیماری معمولا با ناهنجاری کروموزومی t(15;17) همراه است که ژن گیرنده α اسید رتینوئیک (Retinoic Acid Receptor α) بر روی کروموزوم ۱۷ به ژن PML بر روی کروموزوم۱۵ متصل می‌شود(PML- RARα). پروتئین غیرعادی ایجاد شده حاصل از این جابجایی کروموزومی، نقش مهمی در لوکموژنی APL ایجاد می‌کند که پدیده تمایز در آن متوقف شده است.

از طرف دیگر این پروتئین الحاقی بعنوان گیرنده برای داروی ATRA (All Trans Retinoic Acid) بکار می‌رود این دارو باعث تجزیه پروتئین الحاقی و آزاد

[1] کارشناس ارشد هماتولوژی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[2] دانشجوی مقطع دکترای هماتولوژی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران
[3] دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[4] دانشیار بخش خون و انکولوژی بیمارستان دکتر شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[5] استاد بخش خون و انکولوژی بیمارستان دکتر شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 12:27 IRDT on Thursday April 27th 2017

سازی RARα می‌شود در نتیجه تمایز میلوئیدی صورت می‌گیرد(۲-۱).

اما بیمار با دریافت آترای بیشتر به آن مقاومت نشان می‌دهد و موجب عود می‌گردد(٤-۳). علاوه براین، این دارو عارضه‌ای تحت عنوان سندرم اسید رتینوئیک ایجاد می‌کند که شامل: تب، تنگی نفس، ارتشاحات ریوی و آسیب کلیوی است. همچنین ممکن است موجب افزایش گلبولهای سفید در اثر تمایز شود. حدود ۱۰٪ از بیماران بر اثر این سندرم جان می‌سپارند(٦-۵).

تلومراز یک جزء اساسی برای تکثیر سلول‌های سرطانی است. آنزیم تلومراز مسئول حفظ ساختار تلومر می‌باشد. تلومرها برای حفظ و پایداری کروموزوم ضروری می‌باشند(۷). تلومراز در اکثر سلول های سوماتیک نرمال بیان نمی شود و یا میزان بیان آن کم می باشد، اما این آنزیم در سلول‌های سرطانی فعال می شود و یکی از مکانیزم های مهم در نامیرا شدن سلول‌های سرطانی می‌باشد. از آنجا که تلومراز یک جزء اساسی برای تکثیر سلول‌های سرطانی است، مهار فعالیت آنزیم تلومراز ممکن است منجر به اثرات ضد توموری شود(۱۰-۸).

یکی از داروهایی که جزء داروهای شایع بالینی و مهارکننده تلومراز می‌باشد AZT (Azidothymedine) است. این دارو جزء آنالوگ‌های نوکلئوزیدی(تیمدین) است که به همین دلیل در پلیمریزاسیون DNA اختلال ایجاد می‌کند و از سنتز DNA جلوگیری بعمل می‌آورد(٤-۳).

AZT اثرات مختلفی دارد: مهار ترانس کریپتاز، مهارکننده ضعیف DNA پلیمراز پستانداران (آلفا، بتا و گاما) که DNA را سنتز می‌کنند(در نتیجه باعث مهار رشد انواع مختلفی از سلولهای سرطانی می‌شود) اثر سیتوتوکسیسیتی (وارد شدن به DNA سلولی که منجر به شکسته شدن رشته DNA می‌شود)، اثر ضد تکثیری، کند کردن پیشرفت چرخه سلولی، القاء مرگ سلول بوسیله آپوپتوز(۱۱).

Jia-Long Fong و Fredrick A. Blend تاخیر در روند چرخه سلولی، القا آپوپتوز و کاهش فعالیت تلومراز در اثر AZT را در رده سلول سرطانی HepG2 گزارش کردند(۱۱). همچنین Hyun Jung Ji و همکارانش در مطالعه‌ای در کشور کره روی رده سلولی MCF-7 (سلول سرطان پستان) انجام داده و مشاهده کردندAZT باعث پیری سلول، آپوپتوز، تاخیر در رشد سلول، مهار فعالیت تلومراز و کوتاه شدن طول تلومر می‌شود. همچنین نشان دادند که AZT باعث کاهش بیان ژن‌های C-myc و hTERT می‌شود(۱۲).

در این مطالعه اثرAZT که یک مهارکننده تلومراز است بر روی سلولNB4 که سلول مشتق شده از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد است مورد بررسی قرار گرفت که در صورت اثر بخش بودن می‌توان، در درمان این نوع از سرطان و دیگر سرطان‌ها استفاده نمود و اثرات سمی دوز بالای آرسنیک را کاهش داد.

روش بررسی

کشت سلول: برای کشت از سلول NB4 (سلول مشتق شده از سرطان پرومیلوسیتی حاد) استفاده شد. سلول‌ها در محیط RPMI1640 +۱۰٪FBS کشت داده شده ودر انکوباتور ۳۷ ^{o}C و C02 ۵٪ نگهداری شدند. برای انجماد سلول‌ها از محیط۱۰٪ FBS و۹۰٪ DMSO و برای ذوب کردن آن از محیط RPMI1640 + ۲۰٪ FBS استفاده شد.

تیمار سلولی: سلول‌ها با دوزهای مختلف AZT تا روز بیستم تیمار شد.AZT بصورت پودر است (۲۵میلی گرم) که غلظت‌های مختلف از این دارو در مطالعه استفاده شد(۲۰۰،۱۰۰،۵۰ میکرومولار). برای تیمار

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 12:27 IRDT on Thursday April 27th 2017

اولیه از پلیت‌های۱۲خانه‌ای و حجم نهایی ۵۰۰ میکرولیتر در هر چاهک استفاده کردیم.

پس از تیمار هر ۳ روز یک بار تجدید محیط (به همراه دارو) شد و درصد سلول‌های زنده با فاصله زمانی ۲٤ ساعت به مدت ۲۰ روز به وسیله تریپان بلو محاسبه شد.

بررسی زنده مانی: برای بررسی درصد سلول‌های زنده از رنگ تریپان بلو استفاده می‌کنیم. سلول‌های زنده که غشاء ناتراوا نسبت به رنگ TB دارند بی رنگ و سلول‌های مرده که هیچ انتخابی برای ورود رنگ ندارند و رنگ وارد سیتوپلاسم آنها می‌شود به رنگ آبی مایل به بنفش دیده می‌شوند.

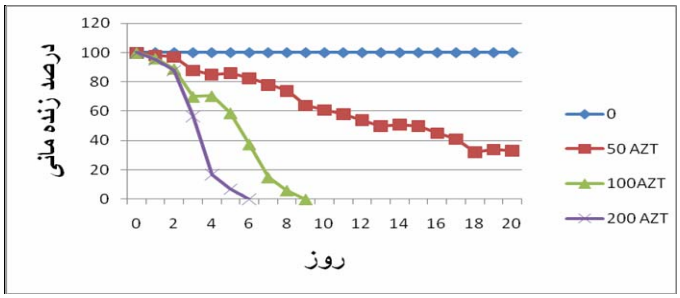
بررسی فعالیت متابولیکی سلول: تیمار سلول‌ها در پلیت‌های ٦ خانه‌ای با حجم نهایی۲cc انجام شد.

آزمایش MTT به مدت ۳ روز بر روی سلول‌های تیمار شده انجام شد.

یافته ها

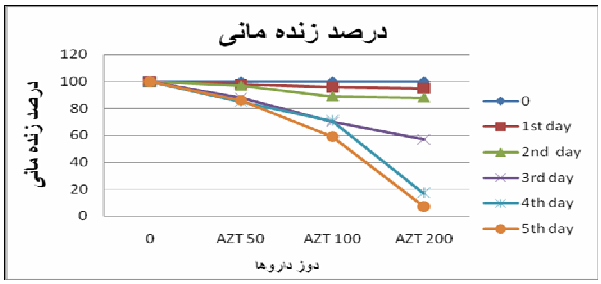
کاهش زنده مانی در اثر AZT

درصد زنده مانی سلول با رنگ تریپان بلو به صورت وابسته به زمان و وابسته به دوز کاهش قابل توجهی داشت. درصد زنده مانی در دوز۵۰ میکرومولار، تا روز بیستم کاهش یافته در دوز۱۰۰ میکرومولار در روز نهم به صفر رسیده و دوز۲۰۰ میکرومولار در روز ششم به صفر رسید. درصد زنده مانی سلول‌های تیمار شده با دوزهای مختلف AZT در نمودار ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱: درصد زنده مانی سلول های تیمار شده با AZT در دوزهای مختلف

در این نمودار مشاهده می‌کنیم که AZT به تنهایی در حالت وابسته به دوز و زمان باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در زنده مانی شده است.

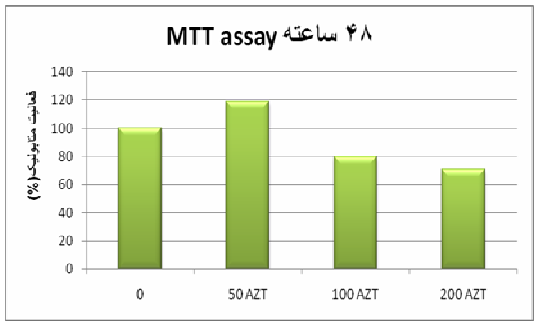


نمودار۲: درصد زنده مانی سلول های تیمار شده با دوزهای مختلف AZT وابسته به دوز

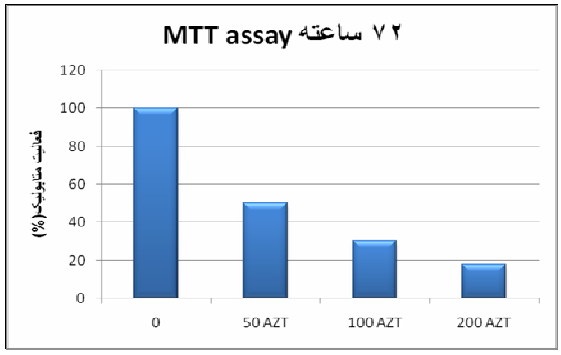
Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 12:27 IRDT on Thursday April 27th 2017

دوز ۲۰۰ میکرومولار AZT باعث کاهش شدید زنده مانی در روز پنجم شده است.

کاهش فعالیت متابولیک سلولی در اثر AZT برای بررسی فعالیت متابولیک سلولی، آزمایش MTT در زمان‌های ٤٨ و ٧٢ ساعت صورت گرفت و همانند زنده مانی سلول، کاهش قابل توجهی در سلول‌های تیمار شده مشاهده شد.



نمودار۳: نمودار فعالیت متابولیک سلول های تیمار شده با دوزهای مختلف AZT در ۴۸ ساعت



نمودار۴: فعالیت متابولیک سلول های تیمار شده با دوزهای مختلف AZT در ۷۲ ساعت

همانگونه که در نمودارهای ۳و٤ مشاهده می‌شود AZT در دوزهای مختلف باعث کاهش فعالیت متابولیک سلولی شده است.

بحث

لوسمی پرومیلوسیتی حاد یا AML-M3 یکی از انواع لوسمی حاد میلوئیدی است که حدود ۱۰-۵ ٪ از مبتلایان به سرطان حاد میلوبلاستی را در بر می گیرد. APL به آترا حساسیت بالایی دارد که در ترکیب با شیمی درمانی موجب بهبودی بالینی موقت می‌شود اما بیمار با دریافت آترای بیشتر به آن مقاومت نشان می‌دهد و بیماری عود می‌کند(۲-۱). علاوه براین، این دارو عارضه‌ای تحت عنوان سندرم اسید رتینوئیک ایجاد می‌کند که شامل: تب، تنگی نفس، ارتشاحات ریوی و آسیب کلیوی است(٦-٥).

درمان با آرسنیک نه تنها در بیماران اولیه بلکه در بیماران مقاوم به آترا موجب درمان طولانی مدت می‌شود اما در دوز بالا آرسنیک موجب ناهنجاری کروموزومی می‌شود یا باعث ناپایداری ژنتیکی و

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 12:27 IRDT on Thursday April 27th 2017

کارسینوژن بودن یا مرگ سلولی می‌شود. AZT مهارکننده ترانس کریپتاز معکوس است که عملکرد آن متوقف کردن نسخه برداری معکوس سلول هاست که باعث متوقف کردن چرخه سلولی، تداخل در تمایز طبیعی و خاتمه دادن تکثیر و مهار رشد سلولی است(۱۵-۱۳ و ۲-۱).

AZT آنزیم های مختلفی در سلول‌های توموری را مهار می‌کند از جمله مهار فعالیت آنزیم تلومراز که بطور نزدیکی مرتبط با تکثیر غیر طبیعی سلول‌های توموری است و نشان دهنده این امر است که AZT می تواند داروی ضدتوموری موثری باشد(۱٦-۱٤و٤). AZT توسط میتوکندری جذب می‌شود و در فضای داخل غشایی تجمع می یابد که موجب مهار آدنیلات کیناز و ترانس لوکاتور ADP/ATP می‌شود و در نهایت ATP سلولی کاهش می‌یابد، همچنین AZT باعث مهار DNA پلیمراز گاما و در نتیجه مهار سنتز DNA میتوکندری می‌شود، در این صورت سنتز ATP کاهش می‌یابد. کاهش ATP سلولی موجب آسیب غیرقابل برگشت و مرگ سلولی می‌شود(۱۹- ۱۷).

در مطالعه‌ای که ما انجام دادیم اثر AZT که یک مهار کننده تلومراز می‌باشد را روی رده سلولی NB4 (رده سلولی مشتق از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) بررسی کردیم. مطالعات مختلفی در بکار بردن AZT روی رده‌های سلولی مختلف انجام شده است و اثرات مختلفی از اینها بررسی و مشاهده شده است.Wagner و همکارانش در New Mexico مطالعه‌ای بر روی MCF-7 (سلول سرطان پستان) انجام دادند و اثر AZT را بررسی کردند در این مطالعه مهار رشد سلولی مشاهده شد، همچنین Jia- Long Fong و Frderick A. Blend تاخیر در روند چرخه سلولی، القا آپوپتوز و کاهش فعالیت تلومراز در اثر AZT را در رده سلول سرطانی HepG2 گزارش کردند(۱۱و۳).

اما تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثر AZT بر سلول‌های NB4 انجام نگرفته است.

در مطالعه‌ای که ما انجام دادیم AZT در دوزهای مختلف باعث کاهش رشد سلولی شد و میزان غلظت AZT استفاده شده با میزان مهار رشد سلولی ارتباط مستقیم دارد(نمودار۱و۲). آزمایش MTT نشان داد که AZT به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان باعث کاهش فعالیت سلولی می‌شود(نمودار۳). این تست نشان داد که IC_{50} این دارو برای این رده سلولی بعد از ۷۲ ساعت دوز ۵۰ میکرومولار می‌باشد.

نتیجه گیری

فاکتورهای زیادی در چرخه تکثیر و آپپتوز سلول نقش دارند. AZT با مکانیسمهای مختلفی باعث آپپتوز و کاهش زنده مانی سلولها می‌شود مثل مهار آنزیم تلومراز، کاهش بیان ژن c-myc و آپپتوز با واسطه فعال کردن کاسپاز(۱۹و۱۵). اما مکانسیمهای مولکولی اثر AZT کاملا مشخص نیست.

در این مطالعه مشاهده شد که AZT باعث کاهش رشد و فعالیت متابولیک سلولی بطور مؤثری شد. از آنجا که به جز این مطالعه تاکنون مطالعه دیگری در رابطه با اثر AZT روی سلول‌های NB4 وجود نداشت، و خصوصا اینکه در رابطه با اثرات AZT روی بیان ژنها، چرخه سلولی و مسیرهای انتقال پیام مطالعات زیادی صورت نگرفته است بنابراین بایستی تحقیقات بیشتری در این موارد صورت گیرد تا مکانسیم اثرات AZT کاملا مشخص شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین و پرسنل محترم مرکز تحقیقات خون وآنکولوژی بیمارستان شریعتی که در انجام این مطالعه با ما همکاری کردند صمیمانه سپاسگزاریم.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 12:27 IRDT on Thursday April 27th 2017

منابع

1. Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, Pendino F, Lanotte M, Aradi J, et al. Retinoid/arsenic combination therapy of promyelocytic leukemia: induction of telomerase-dependent cell death. Leukemia 2005; 19(10); 1806-1811.

2. Chou W, Hawkins A, Barrett J, Griffin C, Dang C. Arsenic inhibition of telomerase transcription leads to genetic instability. Journal of Clinical Investigation 2001; 108(10): 1541-1547.

3. Wagner CR, Ballato G, Akanni AO, McIntee EJ, Larson RS, Chang S, et al. Potent growth inhibitory activity of zidovudine on cultured human breast cancer cells and rat mammary tumors. Cancer Res 1997; 57(12): 2341-2345.

4. Olaussen KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. Crit Rev Oncol Hematol 2006; 57(3): 191-214.

5. Camacho LH, Soignet SL, Chanel S, Ho R, Heller G, Scheinberg DA, et al. Leukocytosis and the retinoic acid syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. Clin Oncol 2000; 18(13): 2620-2625.

6. Sanz MA. Treatment of acute promyelocytic leukemia. The American Society of Hematology 2006; 1(1): 147.

7. Zhang TC, Schmitt MT, Mumford JL. Effects of arsenic on telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells in vitro. Carcinogenesis 2003; 24(11): 1811-1817.

8. Keith WN, Thomson CM, Howcroft J, Maitland NJ, Shay JW. Seeding drug discovery: integrating telomerase cancer biology and cellular senescence to uncover new therapeutic opportunities in targeting cancer stem cells. Drug Discov Today 2007; 12(15-16): 611-621.

9. Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. Oxford Univ Press 2005; 26(5): 867-874.

10. Djojosubroto MW, Choi YS, Lee HW, Rudolph KL. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. Mol cells 2003; 15(2): 164-175.

11. Fang JL, Beland FA. Long-term exposure to zidovudine delays cell cycle progression, induces apoptosis, and decreases telomerase activity in human hepatocytes. Toxicol Sci 2009; 111(1): 120-130.

12. Ji H, Rha S, Jeung H, Yang S, An S, Chung H. Cyclic induction of senescence with intermittent AZT treatment accelerates both apoptosis and telomere loss. Breast cancer research and treatment 2005; 93(3): 227-236.

13. Gomez DE, Tejera AM, Olivero OA. Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT) treatment. Biochem Biophys Res commun 1998; 246(1): 107-110.

14. Rankin AM, Faller DV, Spanjaard RA. Telomerase inhibitors and'T-oligo'as cancer therapeutics: contrasting molecular mechanisms of cytotoxicity. Anticancer Drugs 2008; 19(4): 329-338.

15. Sun YQ, Guo TK, Chen C, Wang j, Wang ZR, Xi Y. Effects of AZT and RNA-protein complex (FA-2-b-) extracted from Liang Jin mushroom on apoptosis of gastric cancer cells.World Gastroenterol 2007; 13(31): 4185-4191.

16. Saretzki G. Telomerase inhibition as cancer therapy. Cancer letters 2003; 194(2): 209-219.

17. Barile M, Valenti D, Quagliariello E, Passarella S. Mitochondria as cell targets of AZT (zidovudine). Gen Pharmacol 1998; 31(4); 531-538.

18. Herbert BS, Wright WE, Shay JW. Telomerase and breast cancer. Breast Cancer Research 2001; 3(3): 146-149.

19. Macchi B, Mastino A. Pharmacological and biological aspects of basic research on nucleoside-based reverse transcriptase inhibitors. Pharmacol Res 2002; 46(6): 473-482.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 12:27 IRDT on Thursday April 27th 2017

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 12:27 IRDT on Thursday April 27th 2017

Detection of viability and metabolic activity of NB4 cell line treated with AZT

Mardani Valandani H[1] (MSc.) - Mirzaee Khalilabadi R[1] (MSc.) - Bashshash D[2] (MSc.) - Einollahi N[3] (Ph.D.) - Ali Moghaddam K[4] (M.D.) Ghavamzade A[5] (M.D.) - Ghaffari H[4] (Ph.D.)

[1] Master of Sciences in Hematology, Medical Laboratory Department, School of Allied Health Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] PhD Student of Hematology, Medical Laboratory Department, School of Allied Health Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Medical Laboratory Department, School of Allied Health Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Associate Professor, Hematology & Oncology Research Center, Sharaiati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Instructor, Hematology & Oncology Research Center, Sharaiati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : Apr 2010
Accepted : Aug 2010

Background and Aim: APL is a Prevalent leukemia that Approximately included 5-10% of patients with acute myeloblastic leukemia. ATRA and recently arsenic is used for treatment. ATRA leadsto resistance to treatment and arsenic is toxic in high doses.AZT induce cell death in different ways. The purpose of this study was Assessment of effect of AZT, a telomerase inhibitor, on NB4 cell line (APL cell line) to reduce toxic effect of high dose arsenic.

Materials and Methods: In this study, viability and metabolic activityof NB4 cells, treated by different concentrations of AZT(50,100,200 µM), was assessed by trypan blue dye method and MTT assay respectively.

Results: Treated cells with AZT=50,100,200µM showed decreased viability, both in dose-dependent and time-dependent through trypan blue dye method and decreased cell metabolic activity by MTT assay.

Discussion and Conclusion: Considering that AZT is able to induce apoptosis and decrease cell activity, it seems AZT is a suitable drug for inhibiting the growth of tumor cells.

*** Corresponding author :**
Ghaffari H;
E -mail :
Shghaffari200 @ yahoo.com

Key words: Acute Promyelocytic Leukemia, NB4 cell, AZT